



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/49, 15/86	A1	(11) 国際公開番号 WO95/30755 (43) 国際公開日 1995年11月16日(16.11.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP95/00893 (22) 国際出願日 1995年5月10日(10.05.95) (30) 優先権データ 特願平6/96794 1994年5月10日(10.05.94) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 久光製薬株式会社 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.)[JP/JP] 〒841 佐賀県鳥栖市田代大官町408番地 Saga, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 島田 隆(SHIMADA, Takashi)[JP/JP] 〒113 東京都文京区千駄木1丁目1番5号 日本医科大学内 Tokyo, (JP) 秋山勝彦(AKIYAMA, Katsuhiko)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 久光製薬株式会社 筑波研究所内 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 弁理士 西澤利夫(NISHIZAWA, Toshio) 〒150 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6F Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : RECOMBINANT HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS VECTOR AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME (54) 発明の名称 組換えヒト免疫不全ウイルスベクターとその製造方法 (57) Abstract <p>A recombinant HIV vector which retains the foreign DNA sequence antagonistic against HIV growth and/or gene expression and wherein the U3 domain of the LTR sequence on the genome 5' side has been replaced by the promoter sequence of a cytomegalovirus. As this vector can express an anti-HIV sequence of, for example, antisense, ribozyme or TAR decoy in HIV-infected cells without fail, it is useful as a material for gene therapy of HIV infection.</p>		

(57) 要約

この発明は、H I Vの増殖および／または遺伝子発現に対して拮抗的に作用する外来性DNA配列を保持するとともに、ゲノム5'側のLTR配列のU3領域がサイトメガロウイルスのプロモーター配列により置換されている組換えH I Vベクターを提供する。

この発明の組換えH I Vベクターは、アンチセンス、リボザイム、TARデコイ等の抗H I V配列をH I V感染細胞で確実に発現するため、H I V感染症に対する遺伝子治療の材料として有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BF	ブルキナ・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャド
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モリタニア	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	KE	ケニア	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	KZ	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ			PT	ポルトガル		
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

組換えヒト免疫不全ウイルスベクターと その製造方法

技術分野

この発明は、組換えヒト免疫不全ウイルスベクターとその製造方法に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、ヒト免疫不全ウイルス（以下、H I Vと略記する）の感染症に対する遺伝子治療等に有用な新しい組換えH I Vベクターとその製造方法に関するものである。

背景技術

近年の細胞への遺伝子導入技術の進歩に伴い、これを遺伝子治療に応用しようとする試みがさかんになさるようになってきた。遺伝子治療とは、疾患の原因遺伝子に対して拮抗的に作用する組換え遺伝子を体内に導入して発現させることで疾患の治療を行なう方法であり、米国においては既にアデノシンデアミナーゼ（A D A）欠損症、低密度リポ蛋白質受容体欠損症、あるいは嚢胞性線維症等の遺伝病、脳腫瘍や悪性黒色腫等の癌に対する遺伝子治療が開始されている。また最近では、A I D Sをはじめとしたウイルス感染症に対する遺伝子治療の基礎的検討も数多くなされている。

このような遺伝子治療において現在行なわれている遺伝子導入法は、マウスのレトロウイルスであるMolony Murine Leukemia Virus（以下、M o M L Vと略記する）

をベクターとして用いる方法が主流となっている。このM o M L Vベクターを用いる利点は、多くの種類の細胞に対して遺伝子導入が可能なことであり、遺伝子治療の対象となる種々の疾患に対して広く用いることができる。しかし、静脈内投与や筋肉内投与等のようなin vivoでの遺伝子導入の場合には、組織特異性を持たないというこのベクターの本質的な性質が逆に欠点となる。つまりこのM o M L Vベクターを患者に直接投与しても、投与部位近傍の細胞にベクターがトラップされてしまい標的細胞に対して遺伝子を導入することが困難となる。また、標的細胞以外の細胞に対して組換え遺伝子が導入されれば副作用の原因ともなりうる。このような理由からM o M L Vベクターを用いた現在の遺伝子治療の基本的なプロトコールは、自家移植による方法、すなわち患者から標的細胞を体外に取り出して培養を行ない、in vitroでベクターを導入し、その後その細胞を再び患者に戻す方法が採られている。しかしこの方法には、①細胞の種類によっては生体外に取り出すのが困難なことや標的細胞のみを選別するために手間がかかること、②無菌的な培養をするための特殊な設備が必要であり、治療を実施できる施設が限定されること等の問題が残されている。

これらの問題を解決するための一つの方法として組織特異的なウイルスベクターの使用が検討されている。すなわち、ヒトのレトロウイルスであるH I Vはウイルスエンベロープ蛋白であるg p 1 2 0がヒトのC D 4陽性T細胞表

面に存在するCD4分子と結合して感染する。そこでこの特異的な感染機構を利用したHIVベクターという新しい組換えウイルスベクターが提案されている (Shimada, T., et al., J. Clin. Invest., 88, 1043, 1991)。HIVベクターの最大の特徴はCD4陽性T細胞に対して高い効率で特異的に外来性遺伝子を導入することができる点である。この組織特異的ベクターは直接患者に投与してin vivoで標的細胞に遺伝子を導入することもできることから、特殊な設備を必要とせず、普通の外来治療として治療行為を行なうことも可能となり、CD4陽性T細胞を標的細胞とした今後の遺伝子治療に大きく貢献するものと期待されている。

遺伝子治療によって治療効果が期待できる疾患は、先天性、後天性を問わず遺伝子の異常が原因で発症する疾患全てが含まれる。特に、致死的であり、かつ治療法が確立されていない癌や後天性免疫不全症候群 (AIDS) 等の疾患に対しては非常に有用性の高い治療方法であると考えられる。

とりわけ、AIDSはHIVに感染することにより免疫不全状態となり、種々の日和見感染症を発症して最終的には確実に死に至る疾患である。AIDSに対する現在の治療薬としてはアジドチミジン (AZT)、ジダノシン (ddI)、ザルシタビン (ddC) 等のヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤が使用されている。しかし、これらの薬剤は既に感染した細胞を除去する作用はなく、その上重篤な

副作用がみられることや耐性ウイルスの出現により薬剤が無効となる例がある等の問題があり、新しい治療薬の開発が強く望まれている。その候補の一つとして、H I Vの増殖および／または遺伝子発現に対して拮抗的に作用するD N AやR N A等の遺伝高分子配列（以下、抗H I V配列と記載することがある）が注目されている。すなわち、H I Vゲノムの特定遺伝子領域に対するアンチセンス鎖、リボザイム、デコイ等である。アンチセンスはゲノム配列に相補的な配列をもつD N AまたはR N A分子で、細胞内でウイルスに由来する遺伝子と部分的に二重鎖を作ることによりウイルスの増殖を阻害したり、遺伝子発現を抑制すると考えられている。Matsukuraらは化学的に合成されたアンチセンスD N Aを培地に添加することにより、培養細胞でのH I Vの増殖を抑制できることを報告している（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 4244-4248, 1989）。リボザイムはR N Aを切断する酵素様の活性をもつR N A分子であり、特に、基質と相補的に結合する部分を任意の配列に変えることができるハンマーヘッド型リボザイムやヘアピン型リボザイムは抗ウイルス剤としての有用性が期待されている（J. Rossi, et al., Pharmac. Ther. 50, 245-254, 1991; M. Yu. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 6340-6344, 1993）。T A Rデコイはtrans-acting factor とcis-acting elementとの結合を競合分子によって競合阻害しようという考え方に基づくものである。すなわち、H I Vではその発現産物T a tがm R N AのT

A R 配列に結合することが遺伝子発現にとって必須であると考えられている。この T A R 配列をもつ R N A 分子 (T A R デコイ) が細胞内に存在すると T a t はこの T A R デコイとの結合に使われてしまい m R N A との結合ができなくなるために H I V が増殖できなくなる。

しかしながら、以上に述べた抗 H I V 配列は D N A 合成装置を用いて簡単に調製することができるという利点があるが、その反面、これらを実際に治療に使うためには、その安定性、溶解度、吸収率などにまだ多くの改良が必要であることや、合成のための費用が高すぎるなどの問題点がある。

また別の試みとして、これら抗 H I V 配列を細胞内で発現させるようにデザインしたプラスミドをリン酸カルシウムやカチオン性脂質を用いた方法、マイクロインジェクションによる方法、あるいは M o M L V ベクターを用いた方法で H I V 感染細胞に導入し、H I V の増殖を抑制しようとする遺伝子治療の基礎的検討も数多くなされている (G. Sczakiel, et.al., Prospects for Antisense Nucleic Acid Therapy of Cancer and AIDS, 179-193, 1991; Sullenger, B.A., et.al., 63, 601-608, 1990; N. Sarver, et. al., Science, 247, 1222-1225, 1990; A. Rhodes and W. James, J. General Virology, 71, 1965-1974, 1990) 。これらの報告においては、細胞内で抗 H I V 配列が発現すること、およびこれらの配列の発現によって細胞に感染した H I V の増殖が抑制されたことが証明されてい

る。しかしながら、このようなプラスミドベクターを用いた遺伝子導入方法では、*in vivo* で標的となる細胞へ特異的に遺伝子を導入することが困難であるばかりか、細胞に対する毒性が強いこと、遺伝子導入操作が煩雑であること、導入された遺伝子の染色体への組み込みがほとんど起こらないために抗ウイルス遺伝子の発現が一過性であること等の大きな問題があり、このままの形で治療に応用することは不可能である。

以上のような理由から、ヒトのH I V感染細胞に抗H I V配列を導入するための最も適した手段として、H I Vそのものをベクターとして用いる遺伝子治療法が提案されている。すなわち、このH I Vベクターを用いることによって、H I Vに感染したC D 4陽性T細胞を特異的な標的細胞として抗H I V配列を導入することが可能となる。

ところで、抗H I V配列がその効果を発揮するためには、H I V遺伝子に相補的に結合することが必須である。ところが、H I Vゲノムは逆転写酵素の読みのあまさから複製ごとに変異を起こしやすく、あらかじめ相補的に結合するようにデザインした抗H I V配列が、実際には標的遺伝子と結合できないことが多い。そこで、変異の起こりにくい部位を標的とした抗H I V配列の設計が重要となる。H I Vゲノムのt a t部位は比較的変異が起こりにくいいうえ、その発現産物であるT a tがH I Vの複製に必須の調節因子であることから、アンチセンスやリボザイム等の抗H I V配列の標的として最適であると考えられている。また、

T a t が結合する T A R 配列部位も同様の理由でデコイの作用部位としてその効果が期待されている。

しかしながら、これまでに提案されている H I V ベクターは、そのゲノム両端の L T R 配列が野生型と同一のものであり、この L T R 配列が導入遺伝子（抗 H I V 配列）のプロモーターとして機能するためには、T a t によるその活性が必要となる。従って、組換えヒト免疫不全ウイルスベクターを調製する際に抗 H I V 配列によって t a t 部位の発現を抑制したり、あるいはその発現産物 T a t を捕捉したりすると、L T R が不活性化してウイルスベクターの力価を著しく低下させてしまうという問題が存在した。

発明の開示

この発明は、従来の H I V ベクターの欠点を解消し、アンチセンス、リボザイム、T A R デコイ等の抗 H I V 配列が H I V 感染細胞で確実に発現する新しい組換え H I V ベクターを提供することを目的としている。

この発明は、ゲノム 5' 側の L T R 配列の U 3 領域がサイトメガロウイルスのプロモーター配列により置換されている組換え H I V ベクターを提供する。

また、この発明は、少なくともゲノム 5' 側の L T R 配列の U 3 領域がサイトメガロウイルスのプロモーター配列により置換されている H I V ゲノムを保持するプラスミドベクターと、少なくとも H I V ゲノムを保持するヘルパープラスミドベクターとを動物細胞にトランスフェクション

し、その培養液からH I V粒子を採取することを特徴とする組換えH I Vの製造方法をも提供する。

なお、この発明においては、組換えH I Vベクターが、H I Vの増殖および／または遺伝子発現に対して拮抗的に作用する外来性D N A配列を保持すること、さらには、その外来性D N A配列が、H I Vゲノムのt a t領域に対するアンチセンス鎖をコードするD N A配列、t a t領域に対するリボザイムをコードするD N A配列、またはT A R領域に対するデコイをコードするD N A配列であることを好ましい態様としてもいる。

この発明の組換えH I Vベクターは、アンチセンス、リボザイム、T A Rデコイ等の抗H I V配列をH I V感染細胞で確実に発現するため、H I V感染症に対するin vivo遺伝子治療の材料として有用である。

図面の簡単な説明

図1は、この発明の製造方法に用いる組換えプラスミドC H X Nの構成図である。

図2は、この発明の製造方法に用いる組換えプラスミドを導入した細胞が発現したR N Aに対するノーザンブロッティングの結果を示す。

図3は、比較例として作成した組換えプラスミドを導入した細胞が発現したR N Aに対するノーザンブロッティングの結果を示す。

図4は、この発明の製造方法により得たウイルス粒子と

比較例それぞれの薬剤耐性コロニー数を示す。

発明を実施するための最良の形態

この発明の組換えH I Vベクターは、そのゲノム5'側のL T R配列が、U 3領域をサイトメガロウイルス（以下、C M Vと略記する）のプロモーター配列に置換したハイブリッド型L T R（以下、C M V - H I V ・ L T Rと略記する）で構成されている。

このような組換えウイルスは、例えば次のような手順で製造することができる。すなわち、少なくとも5'側にC M V - H I V ・ L T Rを保持する組換えプラスミドベクター（例えば、図1参照）と、少なくともH I Vゲノムを保持する組換えプラスミドベクター（ヘルパープラスミド）を各々公知の遺伝子操作法により構築し、これらを公知の方法（例えば、リン酸カルシウム法等）により動物細胞にトランスフェクションする。そしてこのトランスフェクタントを公知の方法で培養し、培養上清中のウイルス粒子を採取することによって、目的とする組換えH I Vベクターを得ることができる。また、アンチセンス鎖やリボザイム、デコイ等の抗H I V配列を保持する組換え体を作成する場合には、例えば図1に示したようなC M V - H I V ・ L T Rを保持するプラスミドベクターに、抗H I V配列をコードするD N A配列を挿入結合すればよい。このようにして挿入された抗H I V配列は、上記ウイルス粒子に保持され、t a t領域に対するアンチセンス鎖やリボザイム、あるいは

はT A Rデコイ等を安定的に発現して、H I Vの増殖や遺伝子発現を効果的に抑制する。

実施例

以下、実施例を示してこの発明をさらに詳しく説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

実施例 1

(プラスミドの構築)

全てのプラスミドの構築に関する操作は一般的な遺伝子操作法を用いて行なった。組換えプラスミドC H X Nは、図1に示すように5'から3'方向に順次、C M V - H I V・L T R、ネオマイシン耐性遺伝子、およびH I V・L T Rを有し、これらをS V 4 0の複製開始点を含むプラスミドベクターに挿入することにより構築した。

実施例 2

(組換えプラスミドによる細胞のトランスフェクションと、トランスフェクションされた細胞の評価)

トランスフェクションの方法は一般的なリン酸カルシウム法で行なった。実施例1によって得たC H X N 10 μ gと、T a tコード配列を有するプラスミド(T A T / L HまたはC G P E)またはT a tコード配列を保持しないプラスミド(L H / B)とを混合し、滅菌精製水および塩化カルシウム水溶液を添加して全量を0.5 mlにした。この混合液を0.5 mlのH B S P緩衝液中に振とうしながら滴下し、30分間室温で放置してプラスミド-リン酸

カルシウム共沈物を得た。比較例として5'から3'方向に順次、H I V・L T R、ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼのプロモーター、ネオマイシン耐性遺伝子、およびH I V・L T Rを有し、これらをS V 4 0の複製開始点を含むプラスミドに挿入することにより構築したプラスミドH X Nに関しても同様の方法により共沈物を調製した。9 c mのディッシュで約7 0 %コンフレントの状態に培養されたC o s細胞の培養液中に各共沈物を添加してC O₂インキュベーター内で4時間インキュベーション後、新鮮な培養液に置換してさらに2日間インキュベーションした。

以上のトランスフェクションで細胞内に導入された遺伝子の発現性は、これらの細胞のR N Aを塩化セシウムを用いた密度勾配遠心法により抽出し、ノーザンブロッティング法により解析することで評価した。得られた結果を図2および図3に示す。

比較例（プラスミドH X N）ではR N Aの発現がT a t依存的に見られるのに対し（図3）、C H X NはT a tのあるなしに拘らずR N Aの発現が観察された（図2）。

実施例 3

（組換えウイルスの調製及び細胞のトランスダクション）

実施例2と同様の方法により、C H X NあるいはH X NをC G P Eと共にトランスフェクションした。トランスフェクションの2日後、培養上清を採取しこれをウイルス液とした。ウイルス液を採取する前日に6 5 m mのディッシュ当たり 2×10^5 個のC D 4陽性H e l a細胞を播種し

ておき、これらのウイルス液またはコントロール群としてトランスフェクションを行なわなかった細胞の培養上清をそれぞれ0.5 mlまたは3 ml、30 μ gのポリブレンと共に添加した（トランスダクション）。CO₂ インキュベーター内に2日間放置後、トリプシン－EDTA混液により細胞をディッシュから剥がし、85 mmのディッシュに再播種した。6時間CO₂ インキュベーター内でインキュベーション後、培養液中にG-418が750 μ g/mlとなるように添加した。さらに7日間インキュベーションし、薬剤耐性を獲得したコロニー数をカウントした。

結果を図4に示す。ウイルスによる遺伝子導入を受けていないコントロール群はコロニーが認められなかった。一方、CHXN群はHXN群と同等かそれ以上の数のコロニーが観察された。この結果は、CHXN、CGPEのトランスフェクションにより組換えウイルスが調製できること、このウイルスは標的細胞に対して遺伝子導入能力があること、および細胞に導入された組換え遺伝子が効率良く発現していることを示している。

産業上の利用可能性

この発明のウイルスベクターは、HIV感染症に対するin vivo遺伝子治療に利用できる。

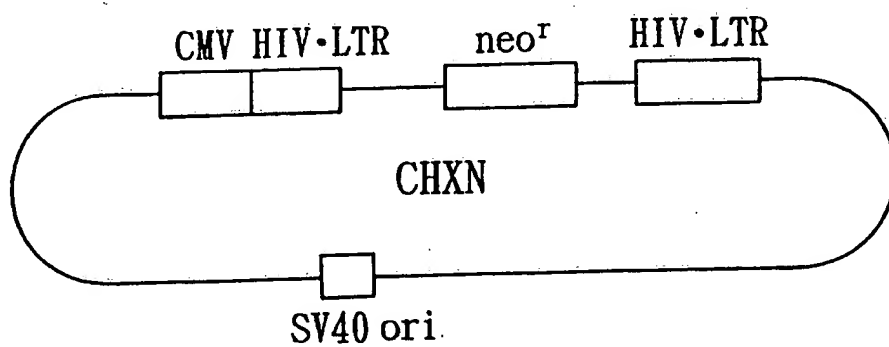
請求の範囲

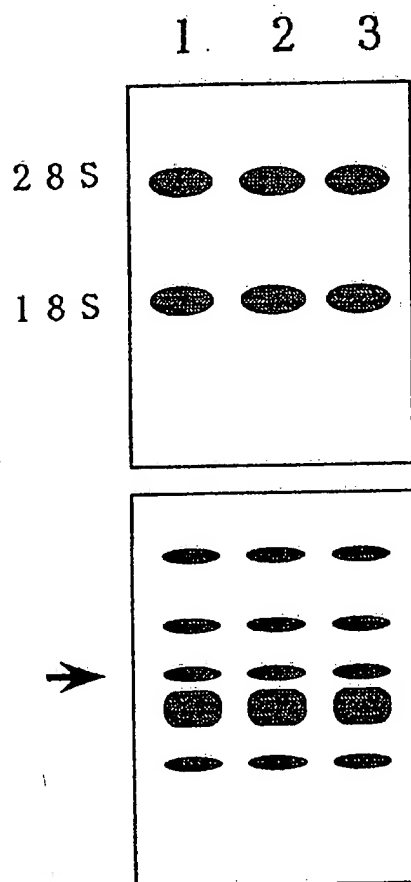
1. ゲノム 5' 側の L T R 配列の U 3 領域がサイトメガロウイルスのプロモーター配列により置換されている組換えヒト免疫不全ウイルスベクター。
2. ヒト免疫不全ウイルスの増殖および／または遺伝子発現に対して拮抗的に作用する外来性 D N A 配列を保持する請求項 1 の組換えヒト免疫不全ウイルスベクター。
3. 外来性 D N A 配列が、ヒト免疫不全ウイルス・ゲノムの t a t 領域に対するアンチセンス鎖をコードする D N A 配列である請求項 2 の組換えヒト免疫不全ウイルスベクター。
4. 外来性 D N A 配列が、ヒト免疫不全ウイルス・ゲノムの t a 領域に対するリボザイムをコードする D N A 配列である請求項 2 の組換えヒト免疫不全ウイルスベクター。
5. 外来性 D N A 配列が、ヒト免疫不全ウイルス・ゲノムの T A R 配列のデコイをコードする D N A 配列である請求項 2 の組換えヒト免疫不全ウイルスベクター。
6. 少なくともゲノム 5' 側の L T R 配列の U 3 領域がサイトメガロウイルスのプロモーター配列により置換されているヒト免疫不全ウイルスゲノムを保持するプラスミドベクターと、少なくともヒト免疫不全ウイルスゲノムを保持するヘルパープラスミドベクターとを動物細胞にトランスフェクションし、その培養液からヒト免疫不全ウイルス粒子を採取することを特徴とする組換えヒト免疫不全ウ

イルスの製造方法。

7. ゲノム 5' 側の L T R 配列の U 3 領域がサイトメガロウイルスのプロモーター配列により置換されているヒト免疫不全ウイルスゲノムを保持するプラスミドベクターが、ヒト免疫不全ウイルスの増殖および／または遺伝子発現に対して拮抗的に作用する外来性 D N A 配列をも保持する請求項 6 のヒト免疫不全ウイルスの製造方法。

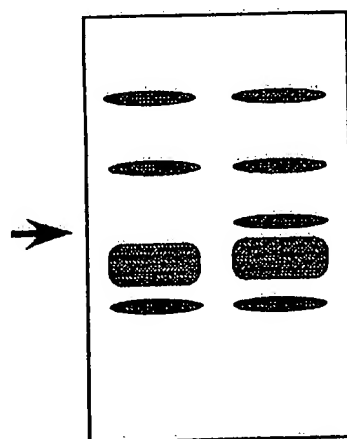
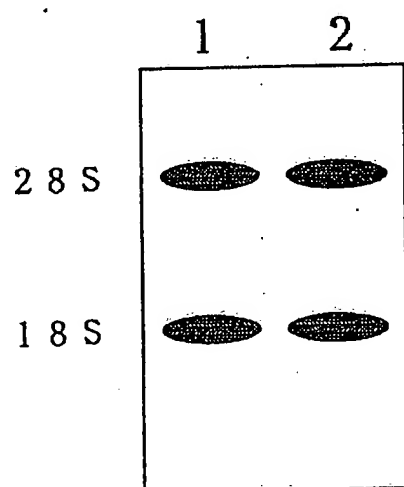
8. 外来性 D N A 配列が、ヒト免疫不全ウイルス・ゲノムの t a t 領域に対するアンチセンス鎖、リボザイムまたは T A R 配列に対するデコイをコードする D N A 配列である請求項 7 の組換えヒト免疫不全ウイルスベクターの製造方法。





1. CHXN + TAT/LH
2. CHXN + LH/B
3. CHXN + CGPE

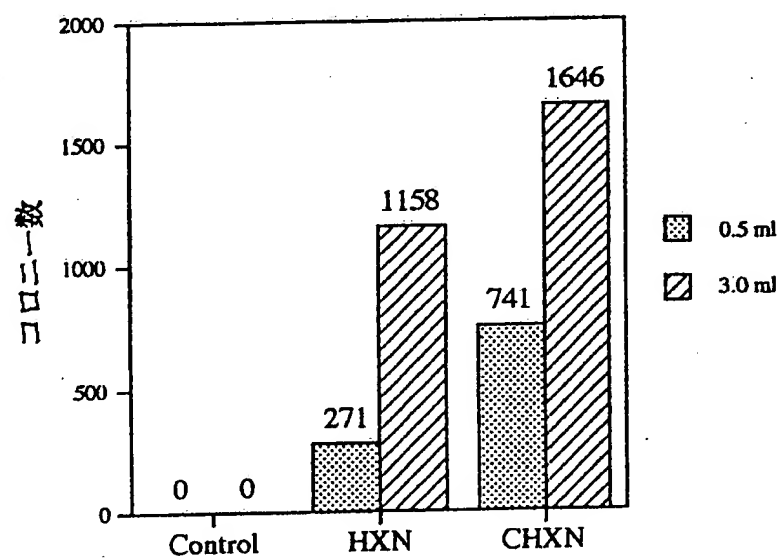
2 1/2



1. HXN + LH/B
2. HXN + TAT/LH

3 12

3/4



4 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP95/00893

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/49, 15/86

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/48-49, 15/86

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/L, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Biological Abstracts Vol. 95, No. 73333 & J, Virol., Vol. 67, No. 2 (1993) p.743-752	<u>1, 6</u> 2-5, 7-8
Y	Science, Vol. 258 (1992)p.1485-1488	2, 3, 7, 8
Y	Cell, Vol. 63 (1990) p.601-608	2, 5, 7, 8
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89 (1992) p.10802-10806	2, 4, 7, 8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

July 28, 1995 (28. 07. 95)

Date of mailing of the international search report

August 22, 1995 (22. 08. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl⁶ C12N15/49, 15/86

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl⁶ C12N15/48-49, 15/86

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	Biological Abstracts Vol. 95, No. 73333 & J. Virol., Vol. 67, No. 2 (1993) p. 743-752	<u>1, 6</u> 2-5, 7-8
Y	Science, Vol. 258 (1992) p. 1485-1488	2, 3, 7, 8
Y	Cell, Vol. 63 (1990) p. 601-608	2, 5, 7, 8
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89 (1992) p. 10802-10806	2, 4, 7, 8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 07. 95

国際調査報告の発送日

22.08.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 明 照

4 B 8 4 1 2

電話番号 03-3581-1101 内線

3448